

ApoE^{-/-} 小鼠颈总动脉粥样硬化不同阶段自噬水平的变化

王洪亮¹, 潘旭东², 马爱军², 杨绍楠², 马娟娟², 张兆志², 李婷², 吴梅¹

(1. 青岛大学医学院组织胚胎学教研室, 山东省青岛市 266071; 2. 青岛大学附属医院神经内科, 山东省青岛市 266100)

[关键词] 自噬; 颈总动脉; 动脉粥样硬化; ApoE^{-/-}; 小鼠

[摘要] 目的 探究在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE^{-/-}小鼠)颈总动脉粥样硬化(As)不同阶段自噬水平的变化情况。方法 40 只 6 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为对照组(10 只)与模型组(30 只, 套管后平均分为 3 组, 分别在套管 2 周、4 周、8 周后处死)。股动脉取血进行血脂检测; 光镜和透射电镜观察右侧颈总动脉显微和超微结构; 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和 Western blot 检测右侧颈总动脉组织中 ATG5、Beclin1、LC3-II 的 mRNA 水平和蛋白的相对表达量。结果 随着套管手术时间增加, ApoE^{-/-}小鼠血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平逐渐升高($P < 0.05$)。光镜观察显示, 对照组管壁结构较为完整, 弹性膜完整且较丰富; 但是随着套管时间的增加, 管壁逐渐加厚, 弹性膜结构逐渐破坏, 泡沫细胞、炎性细胞浸润逐渐增多, 管腔逐渐狭窄。透射电镜观察显示, 随着套管时间增加, 小鼠右侧颈总动脉巨噬细胞内脂滴数目逐渐增多, 自噬体数目在术后 4 周时最高。qRT-PCR 及 Western blot 结果显示, 右侧颈总动脉组织中 ATG5、Beclin1、LC3-II 的 mRNA 和蛋白的相对表达量在术后 4 周时最高($P < 0.05$)。结论 随着 ApoE^{-/-}小鼠颈总动脉 As 的形成自噬持续被激活, 自噬水平在 As 某一时间点(术后 4 周)达到峰值, 而后逐渐降低。

[中图分类号] R543

[文献标识码] A

Changes of autophagy in different stages of carotid atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice

WANG Hong-Liang¹, PAN Xu-Dong², MA Ai-Jun², YANG Shao-Nan², MA Juan-Juan², ZHANG Zhao-Zhi², LI Ting², WU Mei¹

(1. Department of Histology and Embryology, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China; 2. Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266100, China)

[KEY WORDS] Autophagy; Common carotid artery; Atherosclerosis; ApoE^{-/-}; Mice

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes of autophagy of the common carotid atherosclerosis (As) at the different stages in apolipoprotein E gene knockout (ApoE^{-/-}) mice. **Methods** 6-weeks-old male ApoE^{-/-} mice ($n=40$) were randomly divided into two groups and fed with common adaptability diet for 2 weeks. The mice of the control group ($n=10$) received a sham operation and the common diet for another 8 weeks. While the model mice ($n=30$) received a right common carotid artery cannulation and then were randomly subdivided into three groups (the 2 weeks, the 4 weeks and the 8 weeks) and fed with the high fat diet separately for 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks. The blood samples obtained from femoral arteries were studied via the biochemical analysis. The right common carotid arteries were split out for TEM and histopathological study. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blot were used to detect the relative expression levels of mRNA and protein about ATG5, Beclin1 and LC3-II. **Results** As the operation time prolonged the lipid levels especially TG and LDL-C were increased time-dependently. The histopathological analysis results showed that there was a small amount of cells infiltrated in the common carotid artery in the 2 weeks, although the wall was still unspoiled. The vascular wall in the 4 weeks was messy and there was thrombus in the vascular lumen. The thickness of the right common carotid artery in the 8 weeks was higher than the rest and its elastic membranes significantly decreased. The TEM study indicated that the quantity of autophagosomes in the 4 weeks was higher than other

[收稿日期] 2016-08-05

[修回日期] 2016-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81571112)

[作者简介] 王洪亮, 硕士研究生, 研究方向为心脑血管疾病, E-mail 为 1005721020@qq.com。通讯作者吴梅, 教授, 硕士生导师, 研究方向为自噬与心脑血管疾病, E-mail 为 mei_wu786@126.com。

groups and its lipid droplets was still higher than the 2 weeks but lower than the 8 weeks. The qRT-PCR and Western blot detection suggested the mRNA and protein expression of ATG5, Beclin1 and LC3- II in the 4 weeks was higher than the 2 weeks and the 8 weeks, and the expression in the 8 weeks was also higher than those in the 2 weeks. **Conclusion** Autophagy was continuously stimulated during As formation, however, the levels of autophagy will decrease after reaching the peak at a time.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是引起心肌梗死、外周动脉疾病的主要原因^[1]。自噬现象是指细胞内的一个由自噬相关基因(autophagy-related genes, ATG)控制的识别、标记、运输、降解细胞内的细胞器碎片以及吞噬到细胞内的细菌、异物的动态过程^[2-3]。国内外的众多研究已经证明,自噬体存在于参与As形成过程的多种细胞内,如内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞等^[4]。而且,在体外巨噬细胞培养过程中发现,自噬参与了细胞内胆固醇的逆向转运和脂滴的降解过程^[5]。但是,关于在As形成的不同阶段自噬水平动态变化的研究,目前尚未见文献报道。基于本团队之前As动物模型的实验研究^[6-7],本实验通过采用高脂饮食联合颈总动脉套管的方法建立As ApoE^{-/-}小鼠模型,以探究在颈总动脉As形成的不同时间点自噬水平的动态变化规律,并据此推测自噬在As不同阶段的可能作用机制,及其潜在的应用价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性6周龄SPF级ApoE^{-/-}小鼠(体重18~22g)及高脂饲料(0.25%胆固醇+15%脂肪)购于北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.2 实验试剂、仪器

反转录试剂盒No.RR047a、实时荧光定量试剂盒No.420a、TRIZOL、RIPA裂解液、0.45 μm PVDF膜购于大连Takara公司;实时荧光定量用mRNA(ATG5、Beclin1、LC3、GAPDH)引物购于上海生工生物工程股份有限公司;ATG5、Beclin1、LC3抗体购于美国CST公司;ECL化学发光液购于武汉博士德生物工程有限公司;低温高速离心机购于力康生物医疗科技控股有限公司;反转录仪购于天根生化科技有限公司;实时荧光定量仪FTC-3000购于Funglyn Biotech;蛋白电泳仪、电转仪购于美国Bio-Rad公司。

1.3 As动物模型制备

1.3.1 动物分组 40只6周龄SPF级ApoE^{-/-}小鼠单笼饲养,22~25℃,每天自由饮水及12h光照,

普通适应性喂养2周后,随机分为对照组(10只)和模型组(30只),所有小鼠在第2周末进行手术。

1.3.2 右侧颈总动脉套管 所有小鼠术前12h禁食(正常饮水)。腹腔注射10%水合氯醛(0.3 mL/100g),完全麻醉后将小鼠仰卧固定在用75%酒精消毒后的固定板上,颈部脱毛消毒后用灭菌手术剪(高压湿热灭菌,120℃,20min)将小鼠颈部皮肤剪开2cm切口,玻璃分针拨开皮下组织,找到颈动脉鞘,沿鞘中央闭合处打开颈动脉鞘,找到并分离出右侧颈总动脉,注意不要损伤气管及周边的迷走神经,将灭菌过的长约0.3cm、内径0.3mm的硅胶管套置于右侧颈总动脉外围,硅胶管外用3根丝线固定(对照组做颈动脉旁放置硅胶管处理),将分离的组织闭合后缝合切口并做好伤口的清洁。

1.3.3 动物术后处理 术后对照组小鼠继续给予普通饮食,8周后处死;模型组小鼠随机平均分为模型组2周、模型组4周、模型组8周,给予高脂饮食并在颈总动脉套管手术后2周、4周、8周后,分别处死。

1.3.4 动物处死及取材 所有小鼠处死前12h禁食(正常饮水),小鼠腹腔注射10%水合氯醛(0.3 mL/100g)麻醉后固定,剪断股动脉取血(约0.5~1.0mL),检测ApoE^{-/-}小鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的浓度;分离并取出约2cm长右侧颈总动脉,取下硅胶管,用生理盐水清洗以待下一步实验。

1.4 病理切片与超薄切片的制备

1.4.1 颈总动脉组织病理切片的制备 离体的血管用生理盐水清洗后立即浸入30%甲醛溶液固定,经过梯度酒精脱水、浸蜡包埋、切片及苏木精和伊红染色后,用光学显微镜观察颈总动脉血管的结构变化。

1.4.2 颈总动脉超薄切片的制备 离体的血管用生理盐水清洗后立即浸入3%戊二醛固定,梯度乙醇丙酮脱水,经环氧树脂包埋,定位、修块,超薄切片及柠檬酸铅染色后,用透射电镜观察颈总动脉巨噬细胞的超微结构变化。

1.5 实时荧光定量PCR检测

实时荧光定量PCR检测颈总动脉组织中

ATG5、Beclin1、LC3-II mRNA 的表达。每组精确称量右侧颈总动脉组织约 20 mg,用 Trizol 提取血管组织中的总 RNA,测定总 RNA 浓度及纯度,然后取 1 μg 总 RNA 两步法(去 DNA、反转录)反转录成 cDNA,随后以 cDNA 为模版采用 SYBR Green 进行实时荧光定量 PCR 反应,以 GAPDH 为内参,结果分析计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [8]。反应条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,共 40 个循环。mRNA 引物序列如下,ATG5:上游 5'-ATG TCA CCC TTT TGC TTC AAT C-3';下游 5'-AGC CCA GTT GCC TTA TCT AAT C-3'。Beclin1:上游 5'-CTG GGG ACC TTT TTG ACA TC-3';下游 5'-TTG CGG TTC TTT TCC ACG TC-3'。LC3-II:上游 5'-AAT CCC GGT GAT AAT AGA AC-3';下游 5'-TTT CAT CCC GAA CGT CTC C-3';GAPDH:上游 5'-TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3';下游 5'-AAA TGA GCC CCA GCC TTC ATG-3'。

1.6 Western blot 检测

Western blot 检测颈总动脉组织中 ATG5、Beclin1、LC3-II 蛋白的表达。每组精确称量右侧颈总动脉约 20 mg,用加磷酸酶抑制剂的组织裂解液提取血管组织中的总蛋白,BCA 法检测蛋白浓度;取 20 μg 总蛋白样品进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析(80 V 电泳 30 min 后进入分离胶,120 V 电泳 1 h 至胶下端 1 cm 左右)、转膜(200 mA,90 min),随后将 PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温下封闭 2 h,加一抗(1:1 000)室温下摇晃 2 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;TBST 液洗膜(10 min \times 3 次),加二抗(1:5 000)室温下摇晃 2 h;TBST 液洗膜(10 min \times 3 次)后用 ECL 法显影,分析条带灰度,以目的条带与 GAPDH 的灰度比值来表示蛋白相对表达量。

1.7 统计学分析

应用 SPSS19.0 软件进行统计学处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 法。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ApoE^{-/-}小鼠血脂检测

模型组 ApoE^{-/-}小鼠血清 TG、TC、LDLC 水平较对照组均明显升高($P<0.05$)。而且,随着颈总动脉套管手术时间的延长,血清 TC、LDLC 水平均逐渐升高,模型组 8 周血清 TC、LDLC 水平高于模型组 4 周、模型组 2 周($P<0.05$),模型组 4 周血清 TC、

LDLC 水平高于模型组 2 周($P<0.05$,表 1)。

表 1. 各组 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平的比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

Table 1. Comparison of lipid levels in ApoE^{-/-} mice of each group($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

分组	n	TG	TC	LDLC
对照组	10	1.51 \pm 0.45	10.06 \pm 1.12	1.23 \pm 0.90
模型组 2 周	10	3.77 \pm 1.33 ^a	23.63 \pm 0.80 ^{ab}	7.84 \pm 1.27 ^{ab}
4 周	10	3.47 \pm 1.41 ^a	25.75 \pm 0.72 ^{ab}	9.42 \pm 1.12 ^{ab}
8 周	10	3.79 \pm 1.25 ^a	27.18 \pm 0.54 ^{ab}	16.96 \pm 4.13 ^{ab}

a 为 $P<0.05$,与对照组比较; b 为 $P<0.05$,模型组组内比较。

2.2 各组组织病理学观察结果

通过光学显微镜观察 ApoE^{-/-}小鼠右侧颈总动脉 HE 切片发现,对照组(图 1A)血管管壁较薄,内膜较平滑,弹性膜排列紧密连续,管腔无明显变化。模型组 2 周(图 1B)管壁仍较薄,弹性膜结构仍较完整,但部分管壁变厚并且可见有少量细胞浸润。模型组 4 周(图 1C)血管管壁结构较凌乱、弹性膜结构破坏,管壁内见有泡沫细胞、炎性细胞浸润,管腔内有血栓形成。模型组 8 周(图 1D)内膜明显增厚,并见有大量泡沫细胞、炎性细胞浸润,弹性膜结构明显减少,管腔狭窄。

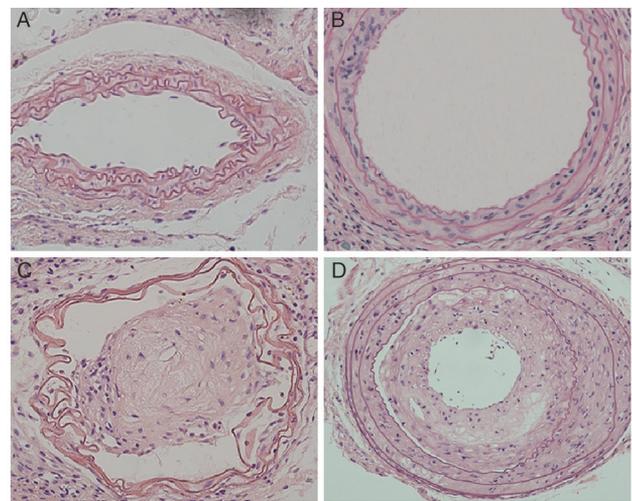


图 1. 各组 ApoE^{-/-}小鼠右侧颈总动脉组织病理学观察(HE, $\times 400$) A 为对照组,B 为模型组 2 周,C 为模型组 4 周,D 为模型组 8 周。

Figure 1. Pathological observation of the common carotid artery with hematoxylin-eosin staining in ApoE^{-/-} mice (HE, $\times 400$)

2.3 透射电镜观察结果

透射电镜结果显示,对照组(图 2A)巨噬细胞

结构完整,细胞内无明显脂滴形成;模型组 2 周(图 2B)巨噬细胞结构仍较完整,细胞内见有少量脂质积聚形成的脂滴(ld 标记)及自噬体结构(箭头标记);模型组 4 周(图 2C)巨噬细胞内含有大量脂滴,与模型组 2 周比较,自噬体数目明显增加;模型组 8 周(图 2D)巨噬细胞内脂滴数目较模型组 4 周增加,但与模型组 4 周比较,自噬体的数目有所减少。

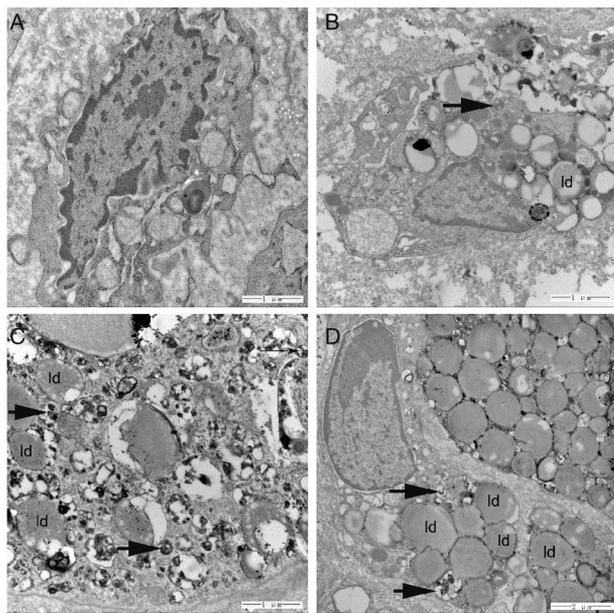


图 2. 各组 ApoE^{-/-} 小鼠右侧颈总动脉巨噬细胞超微结构 A 为对照组, B 为模型组 2 周, C 为模型组 4 周, D 为模型组 8 周。ld 标记为脂滴, 箭头标记为自噬体。

Figure 2. Ultrastructural features of the macrophages in the common carotid artery in ApoE^{-/-} mice

2.4 各组自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II mRNA 水平的比较

qRT-PCR 结果显示, ApoE^{-/-} 小鼠进行右侧颈总动脉套管术后 2 周时, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的 mRNA 相对表达水平与对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$)。术后 4 周、8 周时, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的 mRNA 表达水平均明显高于对照组 ($P < 0.05$)。模型组组内比较得出, 术后 4 周, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的 mRNA 表达水平明显高于术后 2 周和术后 8 周 ($P < 0.05$), 术后 8 周, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的 mRNA 表达水平仍高于模型组 2 周 ($P < 0.05$, 图 3)。

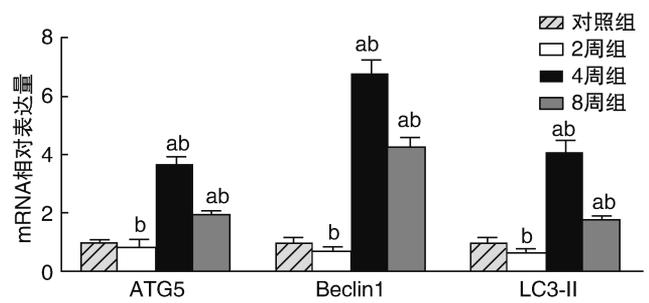


图 3. 各组自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II mRNA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 模型组组内比较。

Figure 3. Comparison of ATG5, Beclin1, LC3- II mRNA levels in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

2.5 颈总动脉组织中 ATG5、Beclin1、LC3- II 蛋白的表达

Western blot 结果显示, ApoE^{-/-} 小鼠进行右侧颈总动脉套管术后 2 周时, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的蛋白表达水平, 较对照组无显著差异 ($P > 0.05$)。术后 4 周、8 周时, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的蛋白表达水平, 与对照组组比较均明显升高 ($P < 0.05$)。模型组组内比较, 术后 4 周时, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的蛋白表达水平较术后 2 周、8 周时均明显升高 ($P < 0.05$), 术后 8 周时, 自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 的蛋白表达水平较术后 2 周时均升高 ($P < 0.05$, 图 4)。

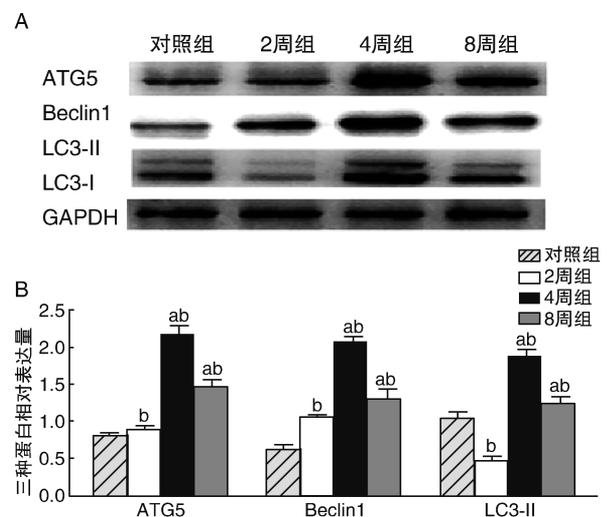


图 4. 各组自噬相关因子 ATG5、Beclin1、LC3- II 蛋白水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) A 为蛋白印迹结果。B 为蛋白印迹灰度值统计分析结果。a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 模型组组内比较。

Figure 4. The expression of ATG5, Beclin1 and LC3- II ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3 讨论

本实验选取 ApoE^{-/-}小鼠为实验对象,采用右侧颈总动脉套管联合高脂喂养方法,试图建立颈总动脉 As 动物模型,以探究自噬在 As 过程中的变化规律。实验结果显示,对照组管壁较薄,管腔无明显变化,并且巨噬细胞结构完整,胞内无明显脂滴形成。与对照组比较,套管联合高脂喂养 2 周后,发现部分管壁增厚且有少量细胞浸润,而且巨噬细胞内可见脂滴和自噬体形成,自噬相关因子 ATG5、Beclin1 和 LC3-II 的 mRNA 及其蛋白相对表达量虽与对照组有差异,但差别无统计学意义。模型组 4 周管壁结构明显凌乱,可见泡沫细胞、炎性细胞浸润,管腔有血栓形成,巨噬细胞内含有少量脂滴和大量自噬体,3 种自噬相关因子的 mRNA 及其蛋白相对表达量均显著高于对照组、模型组 2 周和模型组 8 周。模型组 8 周内膜明显增厚,并有大量泡沫细胞、炎性细胞浸润,造成血管管腔狭窄,巨噬细胞内含有大量脂滴和少量自噬体,3 种自噬相关因子的 mRNA 及其蛋白相对表达量仍显著高于对照组、模型组 2 周。根据以上的主要实验结果可以得出,本实验应用 ApoE^{-/-}小鼠进行右侧颈总动脉套管联合高脂喂养,成功地建立了 As 动物模型,并且较清晰地重现了颈总动脉从管壁部分增厚、管壁结构改变直至弹性膜结构明显减少、管腔狭窄的一系列病理变化,较好模拟了 As 的形成以及其中自噬变化规律的连续过程。不仅为今后进一步研究 As 发病机理和临床治疗,提供了较好的动物模型,而且,通过对 As 不同阶段自噬水平的分析,为下一阶段药物干预实验(如在不同时间点选择性激活或抑制自噬来进一步探究自噬在 As 进程中发挥的作用)提供借鉴。但是,术后 8 周以后,自噬水平的变化情况如何(继续下降或是稳定在较低的水平上),将有待进一步的观察研究。

自噬是细胞内的一种自救机制,在正常生理条件下,自噬在细胞内始终维持在较低水平,但是,当处于饥饿或在某些疾病状态下(如肿瘤^[9-10]、帕金森病^[11-12]),细胞的自噬水平将显著升高。另外,亦有研究发现,当 As 发生后,细胞内的自噬也将被大量激活。例如,用透射电镜观察人主动脉 As 斑块(取材于动脉内膜切除手术)内细胞的超微结构得出,参与 As 斑块形成的多种细胞内都有自噬体存在,在泡沫细胞内脂滴及自噬体数目最多^[4]。本透射电镜研究发现,在术后 2 周,巨噬细胞内已见有脂滴和

自噬体形成,到了术后 4 周,巨噬细胞内的脂滴和自噬体数目远远大于模型组 2 周。在体外实验研究中,采用氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)刺激体外培养普通小鼠和 ATG^{-/-}小鼠巨噬细胞后,通过 Western blot 测定巨噬细胞内自噬信号通路相关蛋白的表达,结果显示野生型巨噬细胞 LC3-II 表达量远远高于对照组,同时也远远高于 ATG5^{-/-}^[13]。本研究发现,术后 4 周,ATG5、Beclin1 和 LC3-II 的 mRNA 和蛋白的表达量均高于对照组和模型组 2 周,与上述结果相似,说明在右侧颈总动脉套管手术和高脂喂养的双重刺激下,小鼠颈总动脉组织自噬大量激活并用于吞噬细胞内堆积的脂质,抑制脂质的积聚和泡沫细胞的形成,可能在一定程度上起到保护颈总动脉和抑制 As 斑块形成的重要作用。

本研究同时也发现,在术后 8 周,巨噬细胞内自噬体数目与模型组 4 周比较明显减少,ATG5、Beclin1 和 LC3-II 的 mRNA 和蛋白的表达量也均明显低于模型组 4 周,虽然仍高于对照组和模型组 2 周。De Meyer 等^[14]发现,在血管巨噬细胞、内皮细胞等降解脂质和清除受损细胞器的过程中,会产生一系列抑制自噬的中间产物,如蜡样质脂褐素和一氧化氮(NO),前者会被细胞内溶酶体吞噬导致溶酶体酶失活,从而抑制自噬溶酶体的形成^[15];后者可以通过抑制 Beclin1 的形成来抑制自噬^[16]。此外,通过免疫组化定量检测人早期和晚期颈动脉 As 斑块(动脉内膜切除手术取出)中的自噬情况得出,与早期斑块(斑块稳定,纤维帽厚度>100 μm)比较,人晚期斑块(斑块不稳定或破裂,纤维帽厚度<100 μm)中自噬相关基因 ATG5 的表达量明显降低,自噬受体蛋白 P62 的表达量明显升高^[17]。说明随着 As 发病时间延长,自噬水平并非持续一直上升,而是在达到某一峰值后开始降低。随着自噬水平的降低,自噬在抑制 As 和保护血管方面发挥的作用可能将会降低。

综上所述,本实验通过采用 ApoE^{-/-}小鼠右侧颈总动脉套管联合高脂喂养方法,成功地建立了 As 动物模型。而且,首次通过在体实验(建立 As 动物模型)研究了自噬与 As 的动态变化关系。通过观察术后 2 周、4 周和 8 周 3 个时间点的颈总动脉组织结构和巨噬细胞超微结构的变化,以及检测颈总动脉组织 ATG5、Beclin1 和 LC3-II 的 mRNA 和蛋白的相对表达量得出,自噬在 As 的形成过程中持续激活,当到达峰值后自噬水平将会逐渐降低。但是,有关自噬水平在术后 8 周以后将会如何变化,以及此过程中自噬具体的作用机制,将有待于在今后的

实验中继续探究。

[参考文献]

- [1] Wang A. Review of vorapaxar for the prevention of atherothrombotic events [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16(16): 2 509-522.
- [2] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [3] Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy [J]. *Cell Research*, 2014, 24(1): 24-41.
- [4] Perrotta I. The use of electron microscopy for the detection of autophagy in human atherosclerosis [J]. *Micron*, 2013, 50(7): 13.
- [5] Ouimet M, Marcel YL. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells [J]. *Arter Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(3): 575-581.
- [6] 徐翔, 吴梅, 李斌, 等. 动脉钳夹联合高胆固醇饮食、维生素 D3 建立大鼠颈总动脉粥样硬化模型[J]. *国际脑血管病杂志*, 2013, 21(4): 288-292.
- [7] 孙清琳, 吴梅, 潘旭东, 等. 阿托伐他汀通过下调核因子- κ B 减轻载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠颈总动脉粥样硬化[J]. *国际脑血管病杂志*, 2015, 23(8): 611-616.
- [8] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] Belaid A, Ndiaye PD, Cerezo M, et al. Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again; emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins [J]. *Autophagy*, 2014, 10(2): 201-208.
- [10] Ling X, Xu C, Fan C, et al. FL118 induces p53-dependent senescence in colorectal cancer cells by promoting degradation of MdmX [J]. *Canc Res*, 2014, 74(24): 7 487-497.
- [11] 樊申元, 靳二辉. 耐力训练对帕金森模型小鼠中脑线粒体自噬相关基因表达的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2015, 30(5): 437-442.
- [12] Ouyang L, Zhang L, Liu B. Autophagy pathways and key drug targets in Parkinson's disease [J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(1): 9-17.
- [13] Ouimet M, Franklin V, Mak E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase [J]. *Cell Metab*, 2011, 13(6): 655-667.
- [14] De Meyer GRY, Grootaert MOJ, Michiels CF, et al. Autophagy in Vascular Disease [J]. *Circ Res*, 2015, 116(3): 468-479.
- [15] Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2007, 462(2): 220-230.
- [16] Sarkar S, Korolchuk VI, Renna M, et al. Complex inhibitory effects of nitric oxide on autophagy [J]. *Mol Cell*, 2011, 43(1): 19-32.
- [17] Li W, Sultana N, Siraj N, et al. Autophagy dysfunction and regulatory cystatin C in macrophage death of atherosclerosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(9): 1 664-672.

(此文编辑 朱雯霞)